

University of Groningen

(Epi)genetic characterization of chemotherapy response in ovarian cancer

Tomar, Tushar

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2016

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Tomar, T. (2016). (Epi)genetic characterization of chemotherapy response in ovarian cancer: Finding better markers, models and targets for therapy. University of Groningen.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

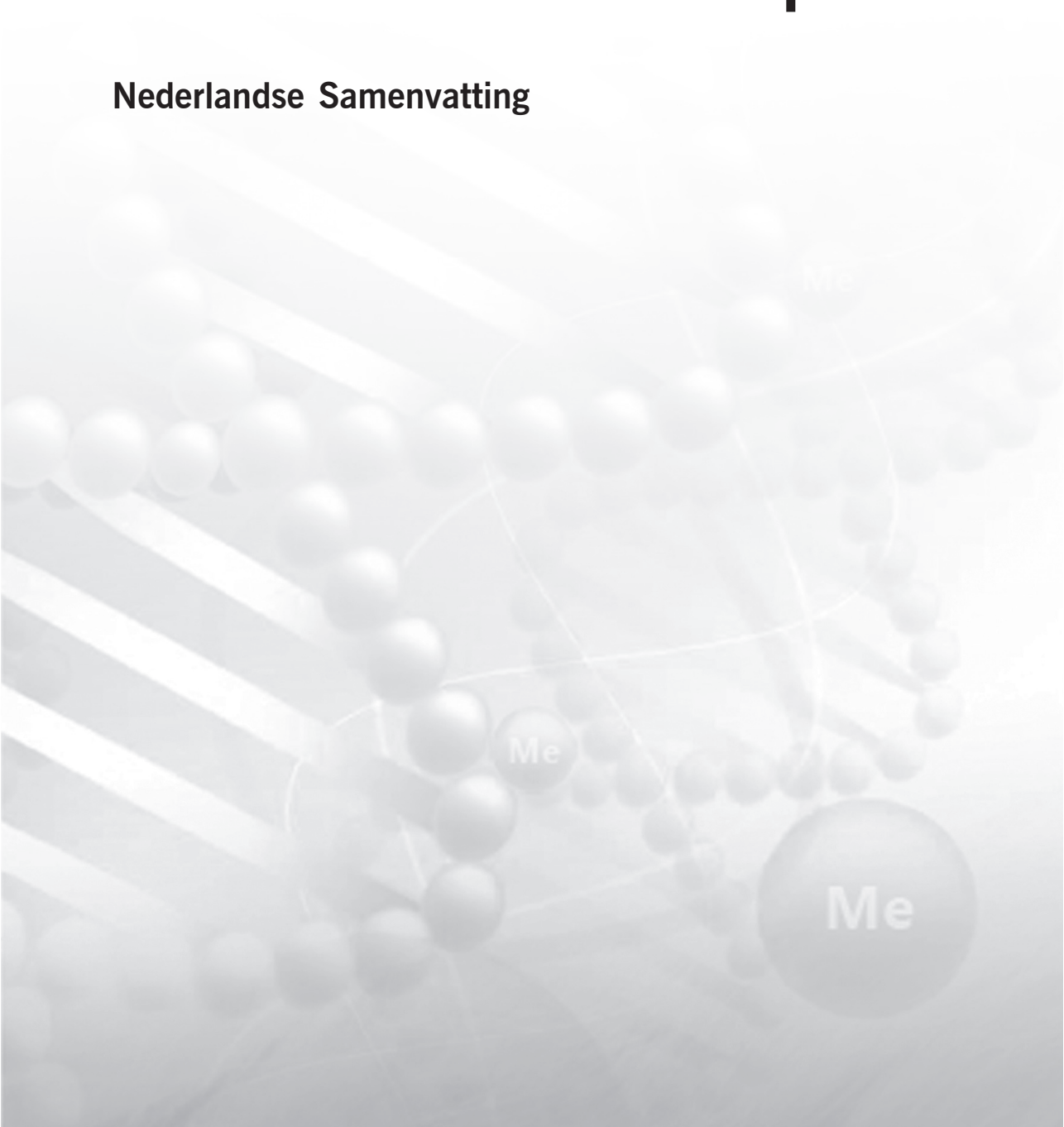
Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Chapter 9

Nederlandse Samenvatting



Summary

Eierstokkanker is de meest voorkomende oorzaak van sterfte door gynaecologische kanker in de Westerse wereld. Wegens gebrek aan specifieke symptomen presenteren de meeste patiënten zich in een vergevorderd stadium van de ziekte. De standaard behandeling van patiënten met vergevorderd stadium eierstokkanker is een operatie waarbij zoveel mogelijk tumorweefsel verwijderd wordt te samen met (neo)adjuvante carboplatinum/paclitaxel chemotherapie. De hoeveelheid achtergebleven tumorweefsel na primaire chirurgie is een sterke voorspeller van de overleving van de patiënten^{1,2}. Het is algemeen aanvaard dat histologische subtypes van eierstokkanker, zoals hooggradig sereus (HGSOC), laaggradig sereus, endometrioïd, mucineus en de heldercellige variant, op verschillende manieren ontstaan³. Naast de verschillende (epi)genetische veranderingen, worden deze subtypen ook gekarakteriseerd door hun variatie in gevoeligheid voor platinum-gebaseerde chemotherapie, waarbij de vergevorderd stadia van de heldercellige, mucineuze en laaggradig sereuze tumoren relatief ongevoelig zijn en HGSOC gevoelig is. Ondanks de goede initiële respons op chemotherapie (70-80%), krijgen de meeste HGSOC patiënten een recidief, dat vervolgens vaak resistent is geworden voor platinum-gebaseerde chemotherapie⁴. Voor HGSOC zijn maar een paar genetische “driver” mutaties bekend, zoals de mutaties in *TP53* en *BRCA1/2*⁵. Daarnaast wordt HGSOC gekenmerkt door veel afwijkende DNA methylatie patronen. DNA methylering houdt in dat een extra methylgroep (-CH₃) aan een cytosine in het DNA wordt gezet. De studies beschreven in dit proefschrift zijn er op gericht om nieuwe genen/biomarkers te identificeren die gerelateerd zijn aan de respons op chemotherapie. Dit is gedaan door de epigenetische (m.a.w. DNA methyloom, dus methylatie over het hele genoom) en de RNA (m.a.w. transcriptoom, dus expressie van genen over het hele genoom) profielen van goed gedefinieerde eierstokkanker patiëntengroepen met betrekking tot de chemorespons te analyseren. Daarnaast wilden we preklinische modellen voor eierstokkanker in de muis opzetten, de zogenaamde “patient-derived xenograft” (PDX) muismodellen, om (epigenetische) biomarkers te kunnen identificeren en valideren. Voor het verkrijgen van een PDX model wordt een klein stukje van de chirurgisch verwijderde tumor van de patiënt geplaatst onder de huid van een muis met een sterk verminderd immuunsysteem. Wanneer het stukje tumorweefsel is uitgegroeid en een bepaalde grootte heeft bereikt, wordt de tumor verwijderd, in kleine fragmenten gesneden en opnieuw in muizen geïmplantatoed.

Door het DNA methyloom van tumormonsters afkomstig van chemotherapie gevoelige en chemotherapie resistente HGSOC patiënten te vergelijken, zouden de meest belangrijke epigenetisch gereguleerde, chemorespons-gerelateerde genen geïdentificeerd kunnen worden. In **hoofdstuk 2**, werd daarvoor een genoom-brede sequentie analyse uitgevoerd, waarbij gemethyleerd genomisch DNA (MethylCap-seq) van primaire tumoren van HGSOC patiënten, bestaande uit extreem goed responderende patiënten (progressievrije overleving ≥ 18 maanden) en niet-responderende patiënten (progressievrije overleving ≤ 6 maanden), werd gebruikt. Na integratie van de RNA expressie gegevens van dezelfde patiënten, werd *FZD10* geïdentificeerd als een nieuw epigenetisch gereguleerd gen. Hoge *FZD10* DNA methylatie en lage *FZD10* genexpressie werden gevonden in de patiëntengroep met een goede respons. De voorspellende waarde van *FZD10* methylatie en genexpressie voor respons en overleving werd met succes bevestigd in verschillende onafhankelijke patiëntengroepen, waarbij wederom hoge DNA methylatie en lage expressie gerelateerd waren aan een langere progressievrije overleving en betere overleving. Uit functionele studies in HGSOC cellijnen bleek dat *FZD10* epigenetisch gereguleerd wordt. Onze resultaten toonden ook aan dat cellen na uitschakeling van *FZD10* gevoeliger werden voor de behandeling met cisplatinum. Concluderend hebben onze bevindingen geresulteerd in de identificatie van *FZD10* als een nieuwe marker voor respons op chemotherapie in HGSOC patiënten.

De DNA schaderespons (DDR) route is cruciaal voor tumorcellen om zichzelf te beschermen tegen door DNA-schade geïnduceerde celdood. Als deel van de DDR, is de Ataxia Telangiectasia gemuteerde (ATM)

signaalroute een mogelijk nieuw doel voor het verbeteren van de cytotoxische werkzaamheid van radio- en/of chemotherapie. In **hoofdstuk 3** werd de activatie status van meerdere componenten van de ATM signaalroute binnen de DDR onderzocht door middel van immunohistochemie in een groot, goed gedefinieerd cohort van chemo-naïeve HGSOC patiënten met een vergevorderd stadium. In twee goed gedefinieerde groepen met het grootste contrast in respons op chemotherapie, was hoge expressie van checkpoint kinase 2 (Chk2) gerelateerd aan een goede respons. Vervolgens werd het effect van Chk2 modulatie op de cisplatinum gevoeligheid in twee eierstokkankercellijnen (SKOV3 en A2780) bestudeerd. Verlaging van Chk2 expressie zorgde ervoor dat het aantal cellen in de cisplatinum-geïnduceerde S-fase van de celcyclus afnam en veroorzaakte resistentie tegen cisplatinum in langdurige overlevingsproeven. Uit deze resultaten kan worden geconcludeerd dat hoge Chk2 expressie is gerelateerd aan een goede respons op platinum-gebaseerde chemotherapie in eierstokkanker patiënten met een vergevorderd stadium. Deze resultaten suggereren tevens dat in de kliniek de kans dat remming van Chk2 in combinatie met platinum-gebaseerde therapie tot goede resultaten leidt, gering is.

PDX-en zijn ontwikkeld als meer representatieve preklinische modellen voor wetenschappelijk onderzoek dan cellijnen, aangezien zowel de heterogeniteit van de oorspronkelijke tumor als de respons op therapie behouden blijft. Het gebruik van PDX-en voor preklinisch kankeronderzoek vereist een juiste opslag van tumormateriaal waardoor de logistiek gemakkelijker wordt en het aantal dieren tot een minimum beperkt blijft. In **hoofdstuk 4** beschrijven we ons panel van 45 eierstokkanker PDX-en, waarin alle belangrijke histologische subtypen vertegenwoordigd zijn. Het bleek dat 68% van de PDX-en groeiden in de muis. In de tweede generatie PDX-en zagen we dat de humane stroma- en endotheelcellen werden vervangen door vergelijkbare cellen van de muis. Dit werd aangetoond met behulp van muis-specifieke vimentine en CD31 immunohistochemische kleuringen. Om biobanking, m.a.w. invriezen van materiaal dat later weer ontdooid en geïmplant wordt, te kunnen gebruiken is het belangrijk de juiste invriesmethode (cryopreservatie) te bepalen. Hiervoor hebben wij twee methoden van cryopreservatie getest, een foetaal kalfsserum (FCS)-gebaseerd (95% v/v) "FCS/DMSO" protocol en een protocol met een lage concentratie serum (10% v/v) "vitrificatie". Na directe cryopreservatie van de humane tumor bleek dat 38% van de tumoren gingen groeien met behulp van de vitrificatie methode en 67% met de FCS/DMSO methode. Wanneer de patiënten tumor eerst in de muis had gegroeid en pas daarna cryopreservatie plaatsvond bleek dat er meer tumoren uitgroeiden in de muis, namelijk 67% voor het vitrificatie en 94% voor het FCS/DMSO protocol. Dat was vergelijkbaar met het percentage tumoren dat uitgroeide (91%), wanneer er geen cryopreservatie plaatsvond en de tumor direct werd overgezet naar de volgende muis. Genotyperingsanalyse toonde aan dat er geen belangrijke veranderingen optraden door een van deze cryopreservatie protocollen. Onze resultaten geven aan dat beide protocollen kunnen worden gebruikt voor biobanking van humaan eierstokkanker en PDX weefsel, waarbij het FCS/DMSO cryopreservatie protocol wat succesvoller is. Voor het verkrijgen van voldoende materiaal voor biobanking is eerst implanteren in de muis, waarna het tumormateriaal uit de muis wordt ingevroren het meest efficiënt.

In verschillende onderzoeken zijn PDX-en vanwege hun gelijkenis met de primaire tumoren betreffende de histologie, ook gekarakteriseerd op genomisch niveau en respons op chemotherapie. HGSOC PDX-en zijn echter nog niet gekarakteriseerd voor hun genoom-brede DNA methylatie status om hun eventuele geschiktheid voor toekomstige epigenetische studies te testen. In **hoofdstuk 5** hebben we met behulp van genoom-brede methylatie arrays het DNA methyloom van primaire tumoren van HGSOC patiënten vergeleken met hun bijbehorende PDX-en over de verschillende generaties. In dit onderzoek wilden we nagaan hoe representatief het methyloom van de HGSOC PDX-en is in vergelijking met hun overeenkomstige primaire tumoren afkomstig van patiënten. Daarna wilden we deze PDX-en gebruiken om het effect van epigenetische therapie en cisplatinum op epigenetisch gereguleerde genen en bijbehorende routes te evalueren. Slechts 0,6-1,0% van alle geanalyseerde cytosines in

het DNA die gemethyleerd kunnen worden (388.696 CpGs, cytosine gevolgd door een guanine) veranderden tijdens de verschillende generaties, waaruit blijkt dat HGSOC PDX-en epigenetisch stabiel zijn. Behandeling van de 3^{de} generatie (F3) PDX-en met decitabine, een DNA demethylerend middel, veroorzaakte een significante verlaging van methylering in 10,6% van de CpGs in vergelijking met onbehandelde PDX-en, terwijl cisplatinum behandeling een marginaal effect had op het DNA methyloom van de PDX tumoren. Uit analyse van decitabine-behandelde PDX tumoren bleek dat verscheidene routes vermoedelijk epigenetisch gereguleerd zijn (bijv. Src familie kinase route). Uit deze analyse bleek ook dat het C-terminaal Src kinase (CSK) gen epigenetisch gereguleerd wordt, wat kon worden gevalideerd in verschillende PDX modellen en eierstokkanker cellijnen. Lage CSK methylatie en hoge CSK RNA expressie waren beide geassocieerd met een betere overleving in HGSOC patiënten. Onze resultaten tonen het belang en de toepasbaarheid van PDX-en voor epigenetische studies van kanker aan.

In vergelijking met andere type tumoren zoals borst-, long- en darmkanker worden zogenaamde doelgerichte therapieën (behandeling met medicijnen die gericht zijn op heel specifieke moleculaire veranderingen in de tumor) voorsnog weinig toegepast in HGSOC. Deze doelgerichte therapieën zijn vaak gericht tegen groeifactoren die worden uitgescheiden door tumorcellen, of tegen groeifactorreceptoren die op de celmembranen van tumorcellen voorkomen. Het succes van veel doelgerichte therapieën is gebaseerd op een aantal factoren, zoals of het geneesmiddel zijn doel in de tumor bereikt en ook of bijvoorbeeld groeifactoren [zoals vasculaire endotheliale groeifactor (VEGF) en insuline groeifactor-1 en 2 (IGF-1/IGF-2)] en hun receptoren in de tumoren specifiek tot expressie komen. De expressieniveaus van allerlei groeifactoren en hun receptoren kunnen veranderen tijdens chemo- en/of doelgerichte therapie, waardoor de behandeling mogelijk minder werkzaam kan zijn. Ten slotte is aangetoond dat zowel verhoogde VEGF als IGF-1 receptor (IGF-1R) expressie betrokken zijn bij chemoresistentie van eierstokkanker^{6,7}. In sommige landen is het VEGF-A antilichaam bevacizumab onderdeel van de standaardbehandeling van eierstokkanker in combinatie met platinum-gebaseerde chemotherapie^{7,8}. Ook worden IGF-1R-gerichte antilichamen, zoals AMG-479 en IGF-1R tyrosine kinase remmers zoals OSI-906 onderzocht in klinische studies, alleen of in combinatie met chemotherapie. Om deze redenen kan ontwikkeling van niet-invasieve methodes voor het aantonen van meerdere tumor-gerelateerde eiwitten (zoals VEGF en IGF-1R) bij individuele patiënten helpen om verschillende doelgerichte behandelingen te selecteren en/of de mate van vroege respons vast te stellen. In **hoofdstuk 6**, hebben we de mogelijkheden onderzocht van duale beeldvorming met behulp van infrarode fluorescentie (NIRF) in meerdere eierstokkanker PDX-en (van 10 verschillende patiënten) met de monoklonale antilichamen bevacizumab (anti-VEGF) en MAB391 (anti-IGF-1R) gekoppeld aan de NIRF kleurstoffen IRDye-800CW en IRDye-680RD. In vivo kinetiek van IRDye-800CW gekoppeld aan bevacizumab liet een snelle daling van de tracer zien in PDX tumoren 24 uur na de injectie. De tegelijkertijd ingespoten IRDye-680RD gekoppeld aan MAB391 was voor meer dan 6 dagen stabiel aanwezig in PDX tumoren, waarbij dit wel afhankelijk was van of de PDX tumor IGF-1R positief was. Dit suggereert dat de stabiele aanwezigheid van MAB391 in de tumor werd veroorzaakt door binding van MAB391 aan IGF-1R op de celmembranen. Kwantificering liet een grote variatie in de maximale fluorescentie intensiteit zien voor beide fluorescente antilichamen, wat de klinisch relevante heterogeniteit van antilichaamopname tussen tumoren van verschillende patiënten laat zien. Na behandeling met cisplatinum werden verhoogde niveaus van beide fluorescente antilichamen gevonden in vergelijking met de onbehandelde PDX-en. Bovendien werd een snelle daling van beide fluorescente antilichamen waargenomen 24 uur na co-injectie in de cisplatinum behandelde PDX tumoren. Onze bevindingen stimuleren de toekomstige toepassing van NIRF beeldvorming in PDX-en en patiëntentumoren voor het ontwikkelen en monitoren van nieuwe therapeutische strategieën, waarbij meerdere doelen en de therapeutische antilichamen tegelijkertijd gevolgd kunnen worden.

Voor de identificatie van de belangrijkste genen die platinum-respons kunnen moduleren, hebben we gebruik gemaakt van openbaar beschikbare HGSOC RNA expressie datasets waarin ook de klinische gegevens van de patiënten zijn beschreven. In **hoofdstuk 7**, werden op basis hiervan functionele genomische mRNA (FGmRNA) profielen gemaakt, waarbij gebruik gemaakt werd van innovatieve methodologie om niet-genetische informatie weg te filteren uit RNA expressie data, van een groot aantal HGSOC patiënten ($n = 422$, allen stadium III-IV). Het doel was om genen te identificeren die waren geassocieerd met progressievrije overleving als een surrogaat marker voor de chemotherapie respons in HGSOC patiënten. De expressie van 303 genen was significant geassocieerd met progressievrije overleving. De genen met een hoge expressie en significant geassocieerd met een slechte progressievrije overleving waren onder andere *MAD1L1*, *PRKD1*, *SUPT20H*, *NFKBIB*, *MMP24-AS1* en *IGF-2R*. De genen geassocieerd met een slechte progressievrije overleving werden vaker gevonden in biologische processen zoals celcyclus, chromosoom, mitose, katabole en microtubuli-gerelateerde processen. Genen en biologische processen met een hogere expressie/activiteit geassocieerd met een goede progressievrije overleving waren onder andere *MPPE1*, *BAG2*, *NEDD8*, *CASP2*, *MRSP11*, *EVI5*, *NFX1* en *PARP1* en celmotorische activiteit, transmembraan- en vesicle-gemedieerd transport, DNA-schade herstel en cytoplasmatische processen. Concluderend, door de toepassing van FGmRNA profielen hebben we genen en daarbij bijbehorende biologische processen geïdentificeerd die geassocieerd zijn met progressievrije overleving in een klinisch goed gedefinieerde groep HGSOC patiënten, behandeld met platinum-gebaseerde chemotherapie.

Tot slot, de resultaten gepresenteerd in dit proefschrift leveren een bijdrage aan onze kennis over de complexe interactie tussen het (epi)genoom en de respons op chemotherapie bij eierstokkankerpatiënten. Toekomstige studies zijn nodig om deze kennis verder te exploiteren door middel van functionele studies om deze nieuw geïdentificeerde chemorespons markers te analyseren en/of de therapeutische doelen te valideren in prospectieve patiënt cohorten. Te samen zal dit voor een effectievere chemotherapeutische behandeling van patiënten met HGSOC kunnen zorgen en uiteindelijk resulteren in een betere overleving van deze patiënten.

References:

1. Horowitz, N. S. *et al.* Does aggressive surgery improve outcomes? Interaction between preoperative disease burden and complex surgery in patients with advanced-stage ovarian cancer: An analysis of GOG 182. *J. Clin. Oncol.* **33**, 937–943 (2015).
2. Chang, S. J., Hodeib, M., Chang, J. & Bristow, R. E. Survival impact of complete cytoreduction to no gross residual disease for advanced-stage ovarian cancer: A meta-analysis. *Gynecol. Oncol.* **130**, 493–498 (2013).
3. Barton, C. A., Hacker, N. F., Clark, S. J. & O'Brien, P. M. DNA methylation changes in ovarian cancer: implications for early diagnosis, prognosis and treatment. *Gynecol. Oncol.* **109**, 129–39 (2008).
4. Cooke, S. L. & Brenton, J. D. Evolution of platinum resistance in high-grade serous ovarian cancer. *Lancet Oncol.* **12**, 1169–1174 (2011).
5. Bell, D. *et al.* Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* **474**, 609–15 (2011).
6. Gottlieb, W. H. *et al.* Insulin-like growth factor receptor I targeting in epithelial ovarian cancer. *Gynecologic Oncology* **100**, 389–396 (2006).
7. Duncan, T. J. *et al.* Vascular endothelial growth factor expression in ovarian cancer: a model for targeted use of novel therapies? *Clin. Cancer Res.* **14**, 3030–3035 (2008).
8. Oza, A. M. *et al.* Standard chemotherapy with or without bevacizumab for women with newly diagnosed ovarian cancer (ICON7): overall survival results of a phase 3 randomised trial. *Lancet Oncol.* **16**, (2015).